

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

**Skelettmuskelfasern des Kaninchens:
Myosinzusammensetzung und Altersabhängigkeit
der Populationen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
HANS WEBER
Tierarzt
von Leuggern AG

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Jenny, Referent
Prof. Dr. C.C. Kuenzle, Korreferent

aku-Fotodruck

Zürich

1980

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

**Skelettmuskelfasern des Kaninchens:
Myosinzusammensetzung und Altersabhängigkeit
der Populationen**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
HANS WEBER
Tierarzt
von Leuggern AG

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. E. Jenny, Referent
Prof. Dr. C.C. Kuenzle, Korreferent

aku-Fotodruck

Zürich

1980



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Rote und weisse Muskeln	1
1.2. Rote und weisse Muskelfasern	1
1.3. Rote (langsame) und weisse (schnelle) Myosine	3
2. PROBLEMSTELLUNG	4
3. MATERIAL UND METHODEN	5
3.1. Kaninchen	5
3.2. Antigene und Antiseren	5
3.3. Anfertigung der Kryostatschnitte	6
3.4. Enzymhistochemie	6
3.5. Immunhistochemie	7
3.6. Mikroskopphotometrie	8
4. RESULTATE UND DISKUSSION	9
4.1. Korrelation von Muskelfasertypen mit Myosintypen	9
4.2. Art und Grösse der Muskelfaserpopulationen im M. tibialis anterior von der Geburt bis ins Alter	10
4.3. Art und Grösse der Muskelfaserpopulationen im M. soleus von der Geburt bis ins Alter	12
4.4. Abschliessende Bemerkungen	13
5. ZUSAMMENFASSUNG	16
6. LITERATURVERZEICHNIS	18
7. DANKESADRESSEN	39
8. LEBENS LAUF	40

Abkürzungen

A	Aktin
AG	Antigen
AK	Antikörper
anti-FM	Antiserum gegen schnelle Myosine des Kaninchens
anti-SM	Antiserum gegen langsame Myosine des Kaninchens
anti-HLC	Antiserum gegen leichte Ketten der Herzmyosine des Kaninchens
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP hydrolysierendes Enzym
D	Degradationsprodukt
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Aethylendiamintetraazetat
EGTA	Aethylen-bis-glykol-tetraazetat
FM	schnelle Myosine
GEDELISA	Gel-electrophoresis-derived-enzyme-linked-immuno-sorbent assay
HC	schwere Ketten der Kaninchenmyosine
HLC	leichte Ketten von Kaninchenherzmyosin
HM	Herzmyosine
LC	leichte Ketten der Kaninchenmyosine
LCf 1, 2 & 3	leichte Ketten 1, 2 und 3 der schnellen Kaninchen-myosine
LCh 1 & 2	leichte Ketten 1 und 2 der Kaninchenherzmyosine
LCs 1 & 2	leichte Ketten 1 und 2 der langsamen Kaninchen-myosine
M.	Musculus
Mm.	Musculi
NADH-TR	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Tetrazolium-reduktase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulphat
SM	langsame Myosine
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid

1. Einleitung

1.1. ROTE UND WEISSE MUSKELN

In Wirbeltieren lassen sich schon makroskopisch rote und blassrot bis weiss gefärbte Muskeln unterscheiden, oder es finden sich im selben Muskel weiss und rot gefärbte Anteile. Die Farbunterschiede sind durch den verschiedenen Gehalt an Myoglobin und mitochondrialem Cytochrom bedingt und weisen auf die vorherrschende Art der ATP-Gewinnung hin. Rote Muskeln sind langsam kontrahierend, eignen sich vor allem für Halte- und Dauerleistungen und beziehen ihr ATP über die oxydative Phosphorylierung. Weisse Muskeln kontrahieren sich schnell, werden für kurze und reflexartige Bewegungen eingesetzt und erhalten ihr ATP vorwiegend aus dem anaeroben Energiestoffwechsel, d.h. der Glykolyse.

1.2. ROTE UND WEISSE MUSKELFASERN

Schon Ranvier (1) und Grützner (2) entdeckten Ende des letzten Jahrhunderts, dass die Farbunterschiede der Muskeln auf Differenzen in ihrer Faserzusammensetzung zurückzuführen sind. Sie teilten denn auch logischerweise die Muskelfasern in rote, langsame und weisse, schnelle ein.

Muskelfasern sind lange, zylindrische Zellen, deren kontraktile Elemente, die Myofibrillen, im Sarkoplasma eingebettet sind. Dieses enthält daneben noch Glykogenkörner, Fettropfen und alle für den Bau- und Energiestoffwechsel nötigen Enzyme sowie Mitochondrien, die je nach Fasertyp in Anzahl, Form, Grösse und Lage variieren. Die Myofibrillen sind aus dicken und dünnen Filamenten in charakteristischer Anordnung, die zur bekannten Querstreifung führt, aufgebaut. Kontraktion und Relaxation

erfolgen durch ein teleskopartiges Gleiten der sich in ihrer Länge nicht verändernden Filamente (3). Dicke Filamente (A-Filamente) bestehen vor allem aus Myosin, dünne Filamente (I-Filamente) enthalten Aktin und den Troponin-Tropomyosin-Komplex. Beim Kontraktionsvorgang verbindet sich Myosin mit Aktin, wobei der Aktomyosin-Komplex ATP spaltet und dessen chemische Energie in mechanische überführt. Das Myosin ist eine ATPase, deren aktives Zentrum in den Myosinköpfchen liegt, das Aktin wirkt katalytisch. Der Troponin-Tropomyosin-Komplex ist zusammen mit Ca^{2+} Ionen an der Steuerung der Kontraktion beteiligt. Eine ausführliche Beschreibung des kontraktile Apparates publizierten Murray und Weber (4). Während Ranvier (1) und Grützner (2) die Muskelfasern nach optischen Kriterien in rote und weisse einteilten, gelang es später mit histochemischen Methoden, die Fasern weiter zu differenzieren. Vor allem Enzyme des oxydativen (5, 6, 7, 8) und des glykolytischen (5, 6, 8) Energiestoffwechsels sowie die Myosin-ATPase (9, 10, 11, 12, 13, 14) wurden eingehend untersucht. Es zeigte sich bald, dass die schnellen Fasern in zwei Untergruppen vorkommen, die sich wesentlich voneinander unterscheiden. Ausserdem wurde ein sogenannt undifferenzierter, vor allem während der Entwicklung vorkommender vierter Fasertyp entdeckt (15). In der Folge gelang es auch, die biochemischen mit physiologischen (16), neurologischen (17) und morphologischen (18) Eigenschaften zu korrelieren. Da fast jeder Autor eine eigene Nomenklatur vorschlug, war die Verwirrung lange Zeit gross. Tabelle 1 enthält eine Synopsis der verschiedenen Nomenklatur-Systeme, wobei wir versucht haben, die Fasertypen nach heutigem Wissen einander zuzuordnen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Muskelfasern des Kaninchens histochemisch und immunchemisch charakterisiert. Die histochemischen Eigenschaften und eine darauf basierende Einteilung nach Brooke und Kaiser (13) sind auf Tabelle 2 dargestellt. Sie enthält zudem zwei weitere Nomenklaturen, die mit jener von Brooke und Kaiser voll kompatibel sind und die häufig stellvertretend für einander gebraucht werden.

Während eine Vielzahl von Arbeiten über Fasertypen erschienen ist, war bis zum Beginn unserer Arbeiten nicht bekannt, ob Art und Grösse der Faserpopulationen von der Geburt weg konstant sind, oder ob sie eine Altersabhängigkeit zeigen.

1.3. ROTE (LANGSAME) UND WEISSE (SCHNELLE) MYOSINE

Myosine sind die mengenmässig wichtigsten kontraktilen Eiweisse. Es sind Hexamere, die aus zwei schweren (HC) und vier leichten Ketten (LC) aufgebaut sind. Das Molekulargewicht beträgt etwa 460 000 Daltons. Im stäbchenförmigen Molekül liegen am einen Ende die schweren Ketten als α -Helix vor, am andern Ende bilden sie je einen köpfchenförmigen Knäuel, an den pro Köpfchen zwei leichte Ketten nicht-kovalent gebunden sind. Schon früh hat man sich gefragt, ob sich die Myosine in roten und weissen Skelettmuskelfasern unterscheiden. Die wichtigste Entdeckung war, dass die Myosin-ATPase Aktivität mit der Verkürzungsgeschwindigkeit einer Muskelfaser positiv korreliert ist (21). Schnell fand man auch heraus, dass rote Myosine nur zwei, weisse hingegen drei Arten leichter Ketten besitzen, die sich im Molekulargewicht und in der Wanderungsdistanz bei der Gelelektrophorese voneinander unterscheiden (22, 23, 24). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die einfache Annahme von nur zwei Isoenzymen falsch ist. So wurden embryonale (25, 26) und foetale (27) Formen beschrieben und adultes weisses Myosin stellte sich als eine Mischung von drei, adultes rotes von zwei Isoenzymen heraus (28). Auch das Herzmyosin besteht aus drei Isoenzymen (29, 30). Zu allem Ueberfluss sollen noch hybride Formen existieren, die aus Mischungen von roten und weissen Ketten bestehen (31, 32, 33). Bisher haben wir von roten und weissen Myosinen gesprochen. In der Praxis hat es sich jedoch eingebürgert, Skelettmuskelmyosine als schnell oder langsam zu bezeichnen, wobei schnelle drei und langsame nur zwei Typen leichter Ketten enthalten. Ausser den Myosinen weisen auch andere Muskelproteine eine typische Faserspezifität auf (34, 35).

Myosine unterscheiden sich nicht nur enzymatisch und strukturell, sondern auch immunologisch (36, 37). Prinzipiell hat sich ergeben, dass sie eine hohe Muskelfasertyp- aber eine kleine Speziesspezifität aufweisen (38, 39), d.h. schnelle Myosine verschiedener Säugetiere sind immunologisch viel näher verwandt als schnelle und langsame der gleichen Spezies. Herzmyosine und Myosine langsamer Skelettmuskelfasern sind sich jedoch sehr ähnlich (37, 40, 41). Komplizierter ist die Immunologie embryonaler und foetaler Myosinisoenzyme. Nach heutiger Ansicht haben sie Determinanten mit adulten langsamen und schnellen Myosinen gemeinsam (42, 43). Antiseren gegen langsame Myosine reagieren immunzytochemisch vor allem mit Typ I-, Antiseren gegen schnelle Myosine mit Typ II-Fasern. Eine Differenzierung der Untergruppen der Typ II-Fasern (IIA, IIB, IIC) mit Myosin-Antiseren war bis zum Beginn unserer Arbeit nicht gelungen.

2. Problemstellung

Wie in der Einleitung dargelegt, werden Muskelfasertypen histochemisch vor allem anhand der Aktivität der Enzyme des Energiestoffwechsels und der Aktivität ihrer Myosin-ATPasen identifiziert (Tab. 2). In unserer Zeit ist es auch möglich geworden, mit Hilfe von spezifischen Antiseren gegen Myosine die Fasern immunzytochemisch zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns das Ziel gesetzt, den histochemisch definierten Fasertypen immunzytochemisch bestimmte Myosintypen zuzuordnen. Zudem haben wir noch in einem schnellen (*M. tibialis anterior*) und in einem langsamen (*M. soleus*) Kaninchenmuskel Art und Grösse der Faserpopulationen von der Geburt bis ins Alter bestimmt, da bisher unbekannt war, ob eine Altersabhängigkeit existiert oder nicht.

3. Material und Methoden

3.1. KANINCHEN

Wir verwendeten New Zealand White Kaninchen aus eigener Zucht. Nur die 5 - 7 jährigen Tiere mussten zugekauft werden und gehörten den unterschiedlichsten Rassen an. Es gelangten Tiere beiderlei Geschlechts zur Untersuchung.

3.2. ANTIGENE UND ANTISEREN

Schnelle Myosine vom *M. longissimus dorsi* (FM) und langsame Myosine vom *M. soleus* (SM) wurden nach Schaub et al. (44) präpariert und über Ionenaustauschchromatographie gereinigt (45). Leichte Ketten der Kaninchenherzmyosine (HLC) (46) wurden uns von Dr. M.C. Schaub (Pharmakologisches Institut der Universität Zürich) freundlicherweise zur Immunisierung überlassen. Antiseren gegen FM, SM und HLC wurden in Meerschweinchen vom Stamm "Himalayan spotted white", ein Geschenk des Institute for Biomedical Research Ltd., Füllinsdorf, Schweiz, erzeugt. Dabei wurde das sogenannte "long term, low dose" Immunisierungsverfahren angewendet (47), das zu nicht präzipitierenden Antikörper hoher Spezifität und geringer Heterogenität führt (48). Die Antiseren charakterisierten wir mit Hilfe der GEDELISA-Technik (47) (Abb. 1a und 1b).

Zwei identische Proben (20 - 50 µg) werden nach Lämmli (49) auf Polyacrylamidgelen in Röhrchen (14.5 x 0.5 cm; Trenngel 12.5%, "staging-gel" 3%) parallel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gel wird anschliessend mit Coomassie brilliant blue gefärbt, das andere in 1 mm Fraktionen geschnitten und jede Fraktion über Nacht in Polystyrolröhrchen mit 0.5 - 1 ml 0.1 M Na-Carbonat, pH 9.6, inkubiert. Die Proteine diffundieren aus den Gel-

stückchen an die Wand der Röhrchen, wo sie gebunden und nachfolgend mit einem konventionellen ELISA-Verfahren (50) nachgewiesen werden. Für unsere Verhältnisse konnten die Antiseren 1 : 100, das Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Peroxidasekonjugat 1 : 1000 verdünnt, angewendet werden.

Aus Abb. 1b ist zu entnehmen, dass anti-HLC-Seren, im Gegensatz zu anti-SM-Seren, mit beiden LC von SM, hingegen vernachlässigbar wenig mit jenen von FM reagierten. Anti-HLC-Seren konnten deshalb zum Nachweis langsamer LC verwendet werden (41).

3.3. ANFERTIGUNG DER KRYOSTATSCHNITTE

Erwachsene Kaninchen wurden durch Genickschuss, eintägige Tiere mit Thiopental getötet und die Mm. solei und M. tibiales anteriores so schnell wie möglich entnommen. Aus diesen wurden sodann kleine Stückchen (0.3 x 0.3 x 0.5 cm) herausgeschnitten, in Freon bei ca. -150°C (gekühlt in flüssigem Stickstoff) tiefgefroren und auf spezielle T-förmige Träger mittels "Ames O.T.C. compound embedding medium for frozen tissue specimens" quer zur Faserrichtung aufgefroren. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte in flüssigem Stickstoff. Geschnitten wurden die Muskelstücke in einem Kryostaten bei -25°C. Die Schnittdicke betrug 8 - 15 µm. Diese Muskelquerschnitte platzierte man bei Zimmertemperatur auf mit Chromalaun-Gelatine überzogene Objektträger. Zur endgültigen Aufbewahrung wurden sie in Glyzerin-Gelatine eingegossen und mit einem Deckglas zugedeckt.

3.4. ENZYM HISTOCHEMIE

Zur histochemischen Fasertypisierung wurden die Enzyme Phosphorylase, E.C. 2.4.1.1., nach der Vorschrift von Edgerton et al. (11), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Tetrazoliumreduktase (NADH-TR), E.C. 1.6.99.3., nach Nachlas et al. (20) und Adenosin-

triphosphatase (ATPase), E.C. 3.6.1.3., nach Brooke und Kaiser (13) auf den Muskelquerschnitten nachgewiesen.

3.5. IMMUNHISTOCHEMIE

Der immunologische Nachweis des Myosintyps in Fasern von Muskelquerschnitten erfolgte mit der indirekten Protein A-Peroxidase-Methode (51). Protein A ist ein Zellwandbestandteil von *Staphylococcus aureus*, der sich spezifisch an die Fc-Region der Immunglobuline der Subklasse G bindet (52). Durch die Kopplung von Protein A mit dem Enzym Peroxidase lässt sich ein entstandener AG-AK-Komplex durch die Umsetzung von Diaminobenzidin/ H_2O_2 von der löslichen, farblosen, in die unlösliche, braune Form nachweisen. Endogene Peroxidase wurde durch Inkubation der Schnitte in Methanol/ H_2O_2 zerstört.

Die spezifischen Inkubationsbedingungen der Protein A-Peroxidase-Technik für den immunhistochemischen Myosin-Nachweis, eingeführt von Celio et al. (51), sind nachstehend detailliert aufgeführt :

1. Aufnehmen der Muskelschnitte vom Kryostat auf zimmertemperaturwarme Objektträger und kurz trocknen lassen.
2. Ueberdecken mit einigen Tropfen einer Lösung von 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA und 0.1 mM DTT, pH 7.0. 5 - 15 Minuten stehen lassen.
3. 30 Minuten fixieren mit einigen Tropfen einer Lösung von 4% N-aethyl-N'-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid-hydrochlorid in 0.07 M Veronal-Acetat-Puffer pH 8.0.
4. 2 mal 5 Minuten waschen in PBS (0.14 M NaCl, 0.003 M KCl, 0.01 M Natriumphosphat, pH 7.3).
5. 30 Minuten inkubieren in Methanol/ H_2O_2 (3%).
6. 3 mal 10 Sekunden waschen in aqua bidest. und 2 mal 10 Minuten in PBS.

7. 1 - 3 Stunden mit Antiserum (verdünnt mit PBS 1:15 für anti-FM und 1:7 für anti-SM und anti-HLC) in feuchter Kammer bei 37°C inkubieren.
8. 2 mal 5 Minuten, in nach Antiseren getrennten Gefässen, mit PBS waschen.
9. Staphylokokkenprotein A-Peroxidase-Konjugat (1:10 in PBS) auftropfen und 30 Minuten in feuchter Kammer bei 37°C reagieren lassen.
10. 2 mal 5 Minuten in PBS waschen.
11. Einige Tropfen einer Lösung von 1.5 mM 3,3'Diaminobenzidin, 0.03% H₂O₂, 0.1 M Tris-HCL, pH 7.0, auftropfen und während 5 - 8 Minuten entwickeln lassen.
12. 2 mal 5 Minuten in PBS waschen.
13. Proben mit Glyzerin-Gelatine versehen und mit einem Deckglas eindecken.

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Staphylokokkenprotein-A-Peroxidase-Konjugat wurde uns grosszügigerweise von Herrn Prof. Dr. H. Fey, vet. bakt. Institut der Universität Bern, zur Verfügung gestellt.

3.6. MIKROSKOPPHOTOMETRIE

Die Firma Wild & Leitz AG, Zürich, stellte uns zuvorkommenderweise ein Leitz Mikroskopphotometer MPV 2 zur Verfügung. Für alle Messungen wurde die kleinstmögliche Objektblende verwendet. Die Extinktionswerte der Fasern wurden mit vorgeschaltetem Filter von 548 nm gemessen und der Nullwert an einer muskelfreien Stelle des Präparates bestimmt.

4. Resultate und Diskussion

4.1. KORRELATION VON MUSKELFASERTYPEN MIT MYOSINTYPEN

Im M. tibialis anterior des erwachsenen Kaninchens lassen sich alle vier Fasertypen (Tabelle 2) eindeutig nachweisen. Wir wählten daher vorerst diesen adulten Muskel für unsere Experimente.

In Abb. 2 sind die enzymhistochemischen und die immunzytochemischen Reaktionen der drei häufigsten Fasertypen dargestellt. Typ I-Fasern reagierten mit anti-SM und anti-HLC, Typ IIB-Fasern mit anti-FM und Typ IIA-Fasern (sowie die hier nicht abgebildeten Typ IIC-Fasern) mit allen drei Antiseren. Um die mit anti-FM und anti-SM erhaltenen Resultate zu objektivieren, wurden zwei benachbarte Schnitte mit je einem der Antiseren angefärbt und die Farbintensitäten von 132 zufällig ausgewählten Fasern photometrisch gemessen. Die Werte wurden mit Hilfe eines Computers einer Häufigkeitsverteilungsanalyse unterzogen und die Resultate graphisch aufgezeichnet (Abb. 3). Es zeigte sich dabei klar, dass jedes der Antiseren drei Faserpopulationen unterscheiden kann, wobei eine davon mit beiden Seren eine intermediäre Reaktion zeigt. Schon 1973 hatten Groeschel-Stewart et al. (53) und vor kurzem wir selbst (47) im M. tibialis anterior mit anti-Myosin-Seren drei Populationen von Fasern entdeckt, eine davon intermediär reagierend, und neulich wiesen Gauthier et al. (42) und Gauthier und Lowey (54) in Rattenmuskeln Fasern nach, die sich mit anti-FM und anti-SM anfärbten. Die Frage nach dem Myosintyp in diesen Fasern, sie sind in unserem Falle vom Typ IIA und IIC, lässt drei Antworten zu :

- a) Es handelt sich um eine Mischung von FM plus SM
- b) Es handelt sich um einen Hybriden, dessen schwere und

leichte Ketten verschiedenen Myosintypen angehören. Solche Hybride wurden von mehreren Autoren vorgeschlagen (31, 32, 33).

- c) Es handelt sich um ein Myosin, dessen Ketten antigene Determinanten von schnellen und langsamen Myosinen enthalten, so wie dies embryonalen Myosinen eigen ist (43).

Gegen die Koexistenz von FM und SM in Typ IIA-Fasern sprechen die Resultate von Weeds et al. (55) und Pette und Schnez (56), die in einzelnen, histochemisch typisierten, schnellen Fasern mit Hilfe der Mikrogelelektrophorese leichte Ketten von SM nicht nachweisen konnten. Mit einer empfindlicheren indirekten immunologischen Methode ist uns dies jedoch neulich gelungen (57). Rubinstein et al. (58) konnten zwar mit Myosinantiseren (direkte Immunfluoreszenz) im M. tibialis anterior nur zwei Fasertypen unterscheiden, teilten uns jedoch kürzlich mit, dass eine Nachprüfung eine Bestätigung unserer Resultate ergeben habe. Untersuchungen an andern Kaninchenmuskeln (M. soleus, Mm. psoas, M. longissimus dorsi) ergaben übereinstimmende Resultate.

4.2. ART UND GRÖSSE DER MUSKELFASERPOPULATIONEN IM M. TIBIALIS ANTERIOR VON DER GEBURT BIS INS ALTER

Art und Grösse der Muskelfaserpopulationen sind auf Tabelle 3 dargestellt. In neugeborenen Tieren konnten nur die Fasertypen I, IIB und IIC nachgewiesen werden. Im Alter von 5-7 Monaten sind die IIC-Fasern praktisch verschwunden und das numerische Verhältnis zwischen den übrigen Fasern ist definitiv etabliert und bleibt bis ins hohe Alter konstant. Unsere Resultate bestätigen jene von Farkas-Bargeton et al. (59), die in menschlichen Muskeln das Erscheinen der Fasertypen in der Reihenfolge IIC, I, IIB und IIA feststellten. Die histochemische Fasertypisierung in Neugeborenen-Muskeln ist nicht problemlos, da die Enzyme des Energiestoffwechsels noch nicht ausgereift sind (60) und die pH-Empfindlichkeit der Myosin-ATPasen etwas verschieden

sein soll (61). Ausserdem ist nicht klar, ob mitochondriale ATPasen mit den Myosin-ATPasen interferieren. Persönlich hatten wir jedoch, wie Farkas-Bargeton et al. (59), keine Mühe, mit Hilfe der Myosin-ATPase Typ I-, IIB- und IIC-Fasern eindeutig zu bestimmen.

Die Reaktion der Muskelfasern mit anti-FM und anti-HLC ist auf Abbildung 4 dargestellt. Die grössten Fasern (Typ I), meist im oder nahe dem Faserbündelzentrum gelegen, reagierten mit anti-HLC, die etwas kleineren Fasern (Typ IIB) mit anti-FM, und die kleinsten Fasern (Typ IIC) mit beiden Antisera. Typ I- und IIC-Fasern färbten sich auch mit anti-SM (nicht gezeigt). Die Reaktion der sogenannten undifferenzierten IIC-Fasern mit allen drei Antisera lässt wiederum drei verschiedene Erklärungen zu (siehe Kapitel 4.1). Am wahrscheinlichsten ist jedoch hier die Annahme, dass sie embryonale (25, 26) oder foetale (27) Isoenzyme enthalten, die antigene Determinanten aller drei adulten Isoenzyme tragen.

Wie schon vorhin erwähnt, lagen die Typ I-Fasern, wenn vorhanden, immer im oder nahe dem Zentrum der Faserbündel. Wir stellten ausserdem fest, dass der dorso-laterale Muskelrand überhaupt keine Typ I-Fasern enthält. Nach Henneman und Olson (17) und Desmedt et al. (62) werden im gleichen Muskel Typ I-Fasern vor den Typ II-Fasern aktiviert. Sie haben wahrscheinlich die Aufgabe, die elastischen Elemente vorzuspannen, damit die Kontraktionsgeschwindigkeit der schnellen Typ II-Fasern voll auf die Haltestrukturen übertragen werden kann. Es bleibt abzuklären, wie weit die spezielle Lage und Verteilung der Typ I-Fasern diese Aufgabe erleichtert. Diese spezielle Funktion dürfte auch ein Grund dafür sein, dass die Typ I-Fasern im Alter nicht wie im M. soleus (siehe 4.3) mindestens teilweise durch Typ II-Fasern ersetzt werden.

4.3. ART UND GRÖSSE DER MUSKELFASERPOPULATIONEN IM M. SOLEUS VON DER GEBURT BIS INS ALTER

Die Muskelfasern im M. soleus neugeborener Kaninchen waren histochemisch (Myosin-ATPase) vom Typ I oder IIC. Typ I-Fasern reagierten mit anti-SM und anti-HLC, Typ IIC-Fasern hingegen mit allen drei Antiseren (Abb. 5). Die immunzytochemische Reaktion der Typ IIC-Fasern lässt sich mit der Annahme erklären, dass auch in präsumptiv langsamen Muskelfasern zuerst Myosine vom schnellen Typ synthetisiert werden, die erst im Laufe der Entwicklung durch langsame Formen ersetzt werden (26, 31, 32, 33, 63). Ob die Anfärbung der Typ IIC-Fasern mit anti-FM durch die Anwesenheit von embryonalem, foetalem oder adultem Myosin vom schnellen Typ bedingt ist, können wir nicht entscheiden. Gesamthaft befinden sich jedoch bei der Geburt noch mehr als 50% aller Fasern in diesem Uebergangsstadium (Abb. 6). Im Alter von 5-7 Monaten enthielten nur noch die Muskeln von drei Kaninchen einige Fasern, die mit anti-FM reagierten und histochemisch als Typ IIA klassifiziert wurden. Mit 12-18 Monaten jedoch war der M. soleus uniform aus Typ I-Fasern aufgebaut. Mit andern Worten braucht dieser Muskel also rund ein Jahr, bis die Populationsgrössen stabil sind. Darin liegt auch der Grund, dass in der Literatur die unterschiedlichsten Faserzusammensetzungen angegeben werden. Unsere Resultate zeigen zudem, dass zur Präparation von reinem, langsamen Myosin genügend alte Tiere verwendet werden sollten.

Zu unserer Ueberraschung traten im hohen Alter wieder reichlich Fasern auf, die mit anti-SM, anti-HLC und anti-FM reagierten (Abb. 6) und deren Myosin-ATPase alkali-stabil war (Abb. 7). Histochemisch gehörten sie den Typen IIA und IIC an. Gelelektrophoretisch liessen sich in solchen Muskeln die leichten Ketten von schnellen und langsamen Myosinen nachweisen (Abb. 8). Ob die schnellen Myosine dem embryonalen, foetalen oder adulten Typ angehören, können wir nicht entscheiden. Die eckige Form der auch mit anti-FM reagierenden Fasern weist auf eine beginnende

Atrophie hin. Wie weit sie primär myogen und sekundär neurogen bedingt ist oder umgekehrt, kann noch nicht entschieden werden. Immerhin ist aber bekannt, dass künstliche Aenderungen des Impulsmusters durch Kreuzinnervation oder elektrische Stimulation die Myosinzusammensetzung der Fasern grundlegend verändern (58, 64, 65, 66) und dass in langsamen Muskeln die Unterbrechung der Innervation die Synthese von schnellen Myosinen induziert (67, 68).

Zusammenfassend sind im M. soleus die Faserpopulationen in Art und Grösse im Gegensatz zum M. tibialis anterior stark altersabhängig.

4.4. ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN

Unsere Resultate zeigen noch nach der Geburt eindruckliche Verschiebungen der Faserpopulationen im M. tibialis anterior und im M. soleus. Während jedoch im M. tibialis anterior die Entwicklung mit etwa fünf Monaten abgeschlossen ist, braucht der M. soleus dafür rund ein Jahr. Ausserdem sind die Populationen im M. tibialis anterior bis ins hohe Alter stabil, während sie sich im M. soleus ab dem vierten Lebensjahr erneut ändern. Mit den Fasertypen ändern sich aber auch die Myosintypen, und es stellt sich die Frage, über welche Mechanismen die Steuerung erfolgt.

Man weiss heute, dass in zukünftig schnellen und langsamen Muskeln zuerst Myosine vom schnellen Typ (foetale oder embryonale) (26, 31, 32, 33, 63) synthetisiert werden. Auch in Zellkulturen können nur schnelle Myosine gefunden werden (69). Ueber den genauen Aufbau der embryonalen schnellen Myosine herrscht jedoch immer noch beträchtliche Unsicherheit. Zunehmende Reifung des Nervensystems mit Uebergang von poly- zu mononeuronaler Innervation führt dann zur Synthese von adulten Myosintypen. Ab diesem Zeitpunkt sind schnelle und langsame Muskelfasern mit Myosinantiseren unterscheidbar (42). Wird ein Muskel denerviert,

unterbleibt eine Differentiation in schnell und langsam oder wird, falls sie schon stattgefunden hat, rückgängig gemacht, d.h. langsame Myosine werden wieder eliminiert (67, 68). Mit Kreuzinnervations- (64, 65) und Elektrostimulationsexperimenten (58, 66) war es möglich, schnelle Fasern in langsame zu transformieren und umgekehrt.

Aus den vorgestellten Experimenten kann man schliessen, dass die Impulsfrequenz der die Muskelfasern versorgenden Nerven die Myosinsynthese entscheidend beeinflusst und dass die Fasern per se immer zur Synthese von schnellen und langsamen Myosinen fähig sind. Neben der Reizfrequenz wird auch von einem möglichen trophischen Faktor des Nervensystems gesprochen, der zur Beeinflussung der Genexpression für die Myosinsynthese fähig sein soll (70).

Ein weiteres, sehr wichtiges Moment stellt die aktive und passive Belastung der Muskeln dar. Besonders deutlich lässt sich dieser Einfluss bei Hochleistungssportlern und bei Rennpferden nachweisen. So findet man bei Langstreckenläufern im M. vastus lateralis mehr langsame, bei Sprintern mehr schnelle Muskelfasern (71). Wird jedoch vom Langstrecken- auf Sprinttraining umgestellt, folgt nach gewisser Zeit eine Aenderung der Faserpopulationen. Snow und Guy (72) zeigten bei verschiedenen Pferderassen eine positive Korrelation zwischen Grundschnelligkeit der Tiere und dem Gehalt an schnellen Muskelfasern.

Die im alten M. soleus vorkommenden Aenderungen können somit als Ausdruck von Bewegungsarmut infolge Senilität und Impulsfrequenzänderung der Neurone durch Degeneration aufgefasst werden. Da aber langsame Myosine nur bei bestimmter Reizfrequenz bestehen bleiben, werden sie demzufolge nach und nach durch schnelle Myosine ersetzt.

Der Skelettmuskel stellt also ein hochadaptives System dar, das sehr differenziert auf die gestellten Anforderungen antworten kann. Dies könnte unter Umständen in der Prophylaxe des PSE-Syndroms bei Schweinen ausgenützt werden. Da vor allem weisse

(schnelle) Muskeln mit schlecht kapillarisierten Fasern betroffen werden, könnte eine konsequente Kontrolle der am meisten betroffenen Muskelbezirke und eine entsprechende Selektion zugunsten grösserer Typ I-Populationen die Anfälligkeit der Schweine wahrscheinlich herabsetzen. Ähnliches gilt für die Schwarzfleischigkeit der Rinder (Glykogenmangel der Fasern). Auch hier wäre ein grösserer Typ I-Gehalt in den meistbetroffenen Muskelpartien und damit eine grössere Resistenz gegenüber Stress erwünscht. Ob sich dies in beiden Fällen durch blosses Muskeltraining mit veränderten Haltungsbedingungen erreichen liesse, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

5. Zusammenfassung

Unter Verwendung von Antiseren gegen schnelles (FM) und langsames (SM) Myosin sowie gegen die leichten Ketten von Herzmyosin (HLC) wurde versucht, den im M. tibialis anterior und M. soleus histochemisch bestimmten Fasertypen Myosintypen zuzuordnen. Ausserdem wurden Art und Grösse der Faserpopulationen in den beiden Muskeln von der Geburt bis ins hohe Alter verfolgt.

Prinzipiell reagierten Typ I-Fasern mit anti-SM und anti-HLC, Typ IIB-Fasern mit anti-FM und Typ IIA- und IIC-Fasern mit allen drei Antiseren. Damit wird klar, dass nur Typ I- und IIB-Fasern mit den von uns verwendeten Antiseren eindeutig bestimmt werden können. Unter Berücksichtigung der Literatur ergibt die Analyse unserer Befunde, dass die Reaktion der Typ IIA- und IIC-Fasern mit allen drei Antiseren drei verschiedene Interpretationen ermöglicht :

- a) Die Fasern enthalten FM und SM.
- b) Die Fasern enthalten einen Myosinhybriden, der aus Ketten von FM und SM zusammengesetzt ist.
- c) Die Fasern enthalten ein embryonales oder ein foetales Myosin, dessen Ketten antigene Determinanten von FM, SM und HLC tragen.

Im M. tibialis anterior neugeborener Kaninchen sind nur die Fasertypen I, IIB und IIC vorhanden, im Adultstadium aber vor allem die Typen I, IIA und IIB, während die IIC-Fasern fast völlig verschwunden sind. Die Populationsgrössen sind im Alter von etwa fünf Monaten etabliert und ändern sich bis ins hohe Alter nicht mehr.

Im M. soleus sind bei der Geburt nur Typ I- und IIC-Fasern vorhanden und im Alter von 5-7 Monaten vor allem Typ I und wenige Typ IIA-Fasern. Mit 12-18 Monaten besteht der Muskel aus-

schliesslich aus Typ I-Fasern. Ab dem 4. Lebensjahr erscheinen jedoch wieder Typ IIA- und IIC-Fasern, die schnelles Myosin enthalten. Damit sind die Faserpopulationen im *M. soleus*, im Gegensatz zu jenen im *M. tibialis anterior*, nur über eine beschränkte Lebenszeit stabil.

6. Literaturverzeichnis *

1. Ranvier, L. (1874)
De quelques faits relatifs à l'histologie et à la physiologie des muscles striés
Arch Physiol Norm Pathol Paris 1, 5-15
2. Grützner, P. (1884)
Zur Anatomie und Physiologie der quergestreiften Muskeln
Rec Zool Suisse 1, 665-684
3. Huxley, H.E. (1969)
The mechanism of muscular contraction
Science 164, 1356-1366
4. Murray, J.M. and Weber, A. (1974)
The cooperative action of muscle proteins
Sci Amer 230, 59-71
5. Dubowitz, V. and Pearse, A.G.E. (1960)
A comparative histochemical study of oxidative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle
Histochemie 2, 105-117
6. Peter, J.B., Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Gillespie, C.A. and Stempel, K.E. (1972)
Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits
Biochemistry (USA) 11, 2627-2633
7. Ogata, T. and Mori, M. (1964)
Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscles
J Histochem Cytochem 12, 171-182
8. Barnard, R.J., Edgerton, V.R., Furukawa, T. and Peter, J.B. (1971)
Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers
Amer J Physiol 220, 410-414
9. Engel, W.K. (1962)
The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease
Neurology 112, 778-794

* Abkürzungen der Zeitschriften-Namen nach "Current Contents", 21 (40), 208-218 (1978)

10. Stein, J.M. and Padykula, H.A. (1962)
Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat
Amer J Anat 110, 103-124
11. Edgerton, V.R. and Simpson, D.R. (1969)
The intermediate muscle fibre of rats and guinea pigs
J Histochem Cytochem 17, 828-838
12. Guth, L. and Samaha, F.J. (1969)
Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle
Exp Neurol 25, 138-152
13. Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. (1970)
Muscle fibre types : how many and what kind ?
Arch Neurol 23, 369-379
14. Samaha, F.J., Guth, L. and Albers, R.W. (1970)
Phenotypic differences between the actomyosin ATPase of the three fiber types of mammalian skeletal muscle
Exp Neurol 26, 120-125
15. Brooke, M.H. and Kaiser, K.K. (1974)
The use and abuse of muscle histochemistry
Ann N Y Acad Sci 228, 121-144
16. Burke, R.E., Levine, D.N., Tsairis, P. and Zajac, F.E. (1973)
Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius
J Physiol London 234, 723-748
17. Henneman, E. and Olson, C.B. (1965)
Relations between structure and function in the design of skeletal muscles
J Neurophysiol 28, 581-598
18. Gauthier, G.F. (1969)
On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle
Z Zellforsch 95, 462-482
19. Padykula, H.A. and Gauthier, G.F. (1967)
Morphological and cytochemical characteristics of fiber types in normal mammalian skeletal muscle
In : Exploratory concepts in muscular dystrophy and related disorders (ed. Milhorat, A.T., Amsterdam), Excerpta Med Found, 117-128
20. Nachlas, M.M., Walker, D.G. and Seligman, A.M. (1958)
A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase
J Biophys Biochem Cytol 4, 29-36

21. Bárány, M. (1967)
ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening
J Gen Physiol 50, 197-218
22. Lowey, S. and Risby, D. (1971)
Light chains from fast and slow muscle myosins
Nature 234, 81-85
23. Weeds, A.G. and Pope, B. (1971)
Chemical studies on light chains from cardiac and skeletal muscle myosins
Nature 234, 85-88
24. Sarkar, S., Sréter, F.A. and Gergely, J. (1971)
Light chains of myosin from white, red, and cardiac muscles
Proc Nat Acad Sci US 68, 946-950
25. Whalen, R.G., Butler-Browne, G.S. and Gros, F. (1978)
Identification of a novel form of myosin light chain present in embryonic muscle tissue and cultured muscle cells
J Mol Biol 126, 415-431
26. Brevet, A. and Whalen, R.G. (1978)
Comparative structural analysis of myosin after limited tryptic hydrolysis by use of two-dimensional gel electrophoresis
Biochimie 60, 459-466
27. Hoh, J.F.Y. and Yeoh, G.P.S. (1979)
Rabbit skeletal myosin isoenzymes from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscles
Nature 280, 321-322
28. Hoh, J.F.Y. (1978)
Light chain distribution of chicken skeletal muscle myosin isoenzymes
FEBS Lett 90, 297-300
29. Lompre, A.M., Schwartz, K., d'Albis, A., Lacombe, G., Van Thiem, N. and Swynghedauw, B. (1979)
Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload
Nature 282, 105-107
30. Sartore, S., Pierobon-Bormioli, S. and Schiaffino, S. (1978)
Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart
Nature 274, 82-83
31. Hoh, J.F.Y. (1979)
Developmental changes in chicken skeletal myosin isoenzymes
FEBS Lett 98, 267-270

32. Rubinstein, N.A., Pepe, F.A. and Holtzer, H. (1977)
Myosin types during the development of embryonic chicken
fast and slow muscles
Proc Nat Acad Sci US 74, 4524-4527
33. Pette, D., Vrbová, A. and Whalen, R.C. (1979)
Independent development of contractile properties and myo-
sin light chains in embryonic chick fast and slow muscle
Pflügers Arch Eur J Physiol 378, 251-257
34. Pool, C.W., Raamsdonk, W., Diegenbach, P.C., Mijzen, P.,
Schenkkan, E.J. and Stelt, A. (1976)
Muscle fibre typing with sera against myosin and actin.
A comparison between enzyme- and immunohistochemical clas-
sification
Acta histochem 57, 20-33
35. Dhoot, G.K. and Perry, S.V. (1979)
Distribution of polymorphic forms of troponin components
and tropomyosin in skeletal muscle
Nature 278, 714-718
36. Arndt, I. and Pepe, F.A. (1975)
Antigenic specificity of red and white muscle myosin
J Histochem Cytochem 23, 159-168
37. Masaki, T. (1974)
Immunochemical comparison of myosins from chicken cardiac,
fast white, slow red and smooth muscle
J Biochem Tokyo 76, 441-449
38. Bruggmann, S. and Jenny, E. (1975)
The immunological specificity of myosins from cross-
striated muscles as revealed by quantitative microcomple-
ment fixation and enzyme inhibition by antisera
Biochim Biophys Acta 412, 39-50
39. Gröschel-Stewart, U., Schreiber, J., Mahlmeister, C. and
Weber, K. (1976)
Production of specific antibodies to contractile proteins,
and their use in immunofluorescence microscopy
Histochemistry 46, 229-236
40. Gröschel-Stewart, U. and Doniach, D. (1969)
Immunological evidence for human myosin isoenzymes
Immunology 17, 991-994
41. Weber, H., Schaub, M.C., Römer, W., Billeter, R., Lutz, H.
and Jenny, E.
in Vorbereitung
42. Gauthier, G.F., Lowey, S. and Hobbs, A.W. (1978)
Fast and slow myosin in developing muscle fibres
Nature 274, 25-29

43. Masaki, T. and Yoshizaki, C. (1974)
Differentiation of myosin in chick embryos
J Biochem Tokyo 76, 123-131
44. Schaub, M.C., Watterson, J.G. and Waser, P.G. (1975)
Conformational differences in myosin. IV. Radioactive labelling of specific thiol groups as influenced by ligand binding
Hoppe-Seylers Z physiol Chem 356, 325-339
45. Richards, E.G., Chung, C.S., Menzel, D.B. and Olcott, H.S. (1967)
Chromatography of myosin on diethylaminoethyl-Sephadex A-50
Biochemistry (USA) 6, 528-540
46. Schaub, M.C. and Perry, S.V. (1971)
The regulatory proteins of the myofibril. Characterization and properties of the inhibitory factor (Troponin B)
Biochem J 123, 367-377
47. Lutz, H., Ermini, M., Jenny, E., Bruggmann, S. Joris, F. and Weber, E. (1978)
The size of the fibre populations in rabbit skeletal muscles as revealed by indirect immunofluorescence with anti-myosin sera
Histochemistry 57, 223-235
48. Portmann, A.J., Levison, S.A. and Dandliker, W.B. (1975)
Equilibrium binding studies on antifuorescein antibody during various stages of the immune response
Immunochemistry 12, 461-466
49. Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685
50. Engvall, E. and Perlmann, P. (1972)
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA; III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes
Immunology 109, 129-135
51. Celio, M.R., Lutz, H., Binz, H. and Fey, H. (1979)
Protein A in immunoperoxidase techniques
J Histochem Cytochem 27, 691-693
52. Dubois-Dalcq, M., McFarland, H. and McFarlin, D. (1977)
Protein A-peroxidase : A valuable tool for the localization of antigens
J Histochem Cytochem 25, 1201-1206

53. Gröschel-Stewart, Z., Meschede, D. and Lehr, I. (1973)
Histochemical and immunochemical studies on mammalian striated muscle fibres
Histochemie 33, 79-85
54. Gauthier, G.F. and Lowey, S. (1979)
Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fibre types
J Cell Biol 81, 10-25
55. Weeds, A.G., Hall, R. and Spurway, N.C.S. (1975)
Characterization of myosin light chains from histochemically identified fibres of rabbit psoas muscle
FEBS Lett 49, 320-324
56. Pette, D. and Schnez, U. (1977)
Myosin light chain patterns of individual fast and slow-twitch fibres of rabbit muscles
Histochemistry 54, 97-107
57. Lutz, H., Weber, H., Billeter, R. and Jenny, E. (1979)
Fast and slow myosin within single skeletal muscle fibres of adult rabbits
Nature 281, 142-144
58. Rubinstein, N.A., Mabuchi, K., Pepe, F., Salmons, S., Gergely, J. and Sréter, F.A. (1978)
Use of type-specific antimyosins to demonstrate the transformation of individual fibers in chronically stimulated rabbit fast muscles
J Cell Biol 79, 252-261
59. Farkas-Bargeton, E., Diebler, M.F., Arsénio-Nunes, M.L., Wherlé, R. et Rosenberg, B. (1977)
Etude de la maturation histochimique, quantitative et ultrastructurale du muscle foetal humain
J Neurol Sci 31, 245-259
60. Pelloni-Müller, G. (1976)
Die postnatale Differenzierung schneller und langsamer Skelettmuskeln des Kaninchens
Inaugural Dissertation, Philosophische Fakultät II der Universität Zürich, Zürich
61. Guth, L. and Samaha, F.J. (1972)
Erroneous interpretations which may result from application of the "myofibrillar ATPase" histochemical procedure to developing muscle
Exp Neurol 34, 465-475
62. Desmedt, J.E. and Godaux, E. (1977)
Fast motor units are not preferentially activated in rapid voluntary contractions in man
Nature 267, 717-719

63. Pelloni-Müller, G., Ermini, M. and Jenny, E. (1976)
Myosin light chains of developing fast and slow rabbit skeletal muscle
FEBS Lett 67, 68-74
64. Hoh, J.F.Y. (1975)
Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins : an electrophoretic analysis
Biochemistry (USA) 14, 742-747
65. Weeds, A.G. and Burridge, K. (1975)
Myosin from cross-reinnervated cat muscles. Evidence for reciprocal transformation of heavy chains
FEBS Lett 57, 203-208
66. Pette, D. and Schnez, U. (1977)
Coexistence of fast and slow type myosin light chains in single muscle fibres during transformation as induced by long term stimulation
FEBS Lett 83, 128-130
67. Rubinstein, N.A. and Kelly, A.M. (1978)
Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat
Develop Biol 62, 473-485
68. Carraro, U., Catani, C. and Biral, D. (1979)
Selective maintenance of neurotrophically regulated proteins in denervated rat diaphragm
Exp Neurol 63, 468-475
69. Rubinstein, N.A. and Holtzer, H. (1979)
Fast and slow muscles in tissue culture synthesise only fast myosin
Nature 280, 323-325
70. Eldridge, L. and Mommaerts, W. (1980)
Ability of electrically silent motoneurons to specify fast and slow muscle properties
In : Plasticity of Muscle (ed. D. Pette), Walter de Gruyter, Berlin-New York
71. Jansson, E., Sjödin, B. and Tesch, P. (1978)
Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training
Acta physiol scand 104, 235-237
72. Snow, D.H. and Guy, P.S. (1979)
Muscle fibre type composition of a number of limb muscles in different types of horse
Res vet Sci, in press

Tabelle 1 - Muskelfasertypen : Histochemische Merkmale und vorgeschlagene Nomenklaturen

A u t o r e n	K l a s s i f i z i e r u n g	
Dubowitz & Pearse (5)	Type I	Type II
Engel (9)	Type I	Type II
Ogata & Mori (21)	Medium	Red
Stein & Padykula (10)	B	C
Padykula & Gauthier (19)	Intermediate	Red
Henneman & Olson (17)	C	B
Barnard et al. (8)	Slow twitch intermediate	Fast twitch red
Brooke & Kaiser (13)	Type I	Type IIA
Peter et al. (6)	Slow twitch oxidative	Fast twitch oxidative/glycolytic
Burke et al. (16)	Slow contracting, fatigue resistant Type S	Fast contracting, fast fatigue Type FF

Tabelle 1 - Fortsetzung

Histochemische Eigenschaften	K l a s s i f i z i e r u n g		
Oxidative Enzymaktivität (5, 6, 7, 8)	High or intermediate	Intermediate or high	Low
Mitochondriale ATPase (18)	Intermediate	High	Low
Glykolytische Enzymaktivität (5, 6, 8)	Low	Intermediate	High
Myofibrilläre ATPase bei pH 9.4 (9, 10, 11)	Low	High	High
pH-Empfindlichkeit der myofibrillären ATPase (12, 13, 14)	Acid stable alkali labile	Acid stable alkali stable	Acid labile alkali stable
Formaldehydepfindlichkeit der myofibrillären ATPase (10, 12)	-	Stable	Sensitive

Tabelle 2 - Kaninchen-Skelettmuskelfasern : Histochemische Merkmale und
vorgeschlagene Nomenklaturen

NOMENKLATUR NACH :

Brooke & Kaiser (13)	I	IIA	IIB	IIC
Peter et al. (6)	slow twitch oxidative	fast twitch oxidative/glycolytic	fast twitch glycolytic	-
Burke et al. (16)	slow contracting, fatigue resistant S	fast contracting, fatigue resistant FR	fast contracting, fast fatigue FF	-

HISTOCHEMIE

ATPase (13) , Vorinkubation bei pH 4.35	+++	-	-	+(+)
4.60	+++	-	+	+(+)
10.80	-	+++	+++	+(+)
Phosphorylase (11)	-	++(+++)	+++	++
NADH-Tetrazolium- reduktase (20)	+++	++	-(+)	+++

Tabelle 3 - Muskelfasertypen und Grösse der Populationen (in %) im M. tibialis anterior
in den verschiedenen Altersstufen

Fasertyp	Geburt	5 - 7 Monate	12 - 18 Monate	4 - 7 Jahre
I	6 *	6 *	6 *	4 *
IIA		38 *o	30 *o	34 *o
IIB	42 o	56 o	64 o	62 o
IIC	52 *o	< 1 *o	< 1 *o	< 1 *o

* = Fasern, die mit anti-SM und anti-HLC reagierten

o = Fasern, die mit anti-FM reagierten

N = 5; pro Schnitt wurden 400 - 500 Fasern ausgezählt.

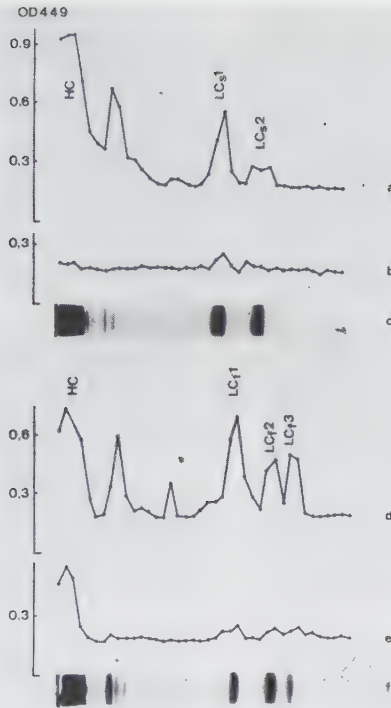


Abbildung 1a

Charakterisierung der Meerschweinchen-Antiseren gegen SM und FM vom Kaninchen mit Hilfe der GEDELISA-Technik (47).

c, f, mit Coomassie blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgele nach Elektrophorese von SM (c) und FM (f)

Immunogramme : a, SM mit anti-SM, b, SM mit anti-FM, d, FM mit anti-FM, e, FM mit anti-SM

Die relativ grosse Kreuzreaktion von SM mit der HC von FM ist durch Kontamination von FM mit SM bedingt (47).

HC	schwere Ketten der Kaninchenmyosine
LCs 1 & 2	leichte Ketten der langsamen Kaninchenmyosine
LCf 1, 2 & 3	leichte Ketten der schnellen Kaninchenmyosine
OD	Extinktion

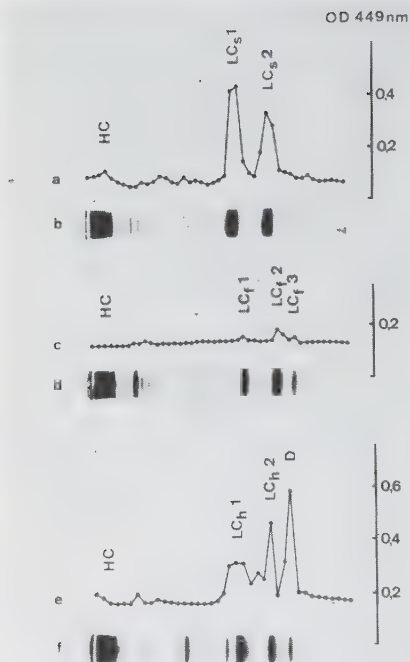


Abbildung 1b

Charakterisierung der Meerschweinchen-Antiseren gegen die leichten Ketten von Herzmyosinen mit Hilfe der GEDELISA-Technik (47).

- b, d, f mit Coomassie blue gefärbte SDS-Polyacrylamidgele nach Elektrophorese von SM (b), FM (d) und HM (f)
- a, c, e Immunogramme von SM (a), FM (c) und HM (e) mit anti-HLC LCh 1 & 2
- LCh 1 & 2 leichte Ketten 1 & 2 der Kaninchenherzmyosine
- D Degradationsprodukt

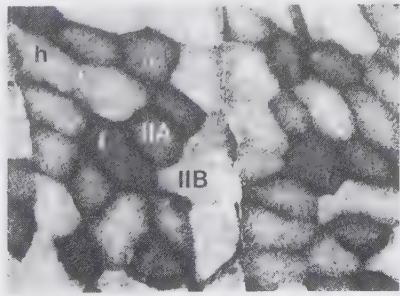
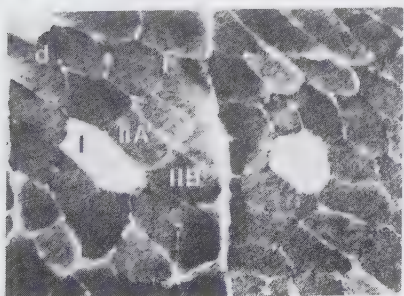
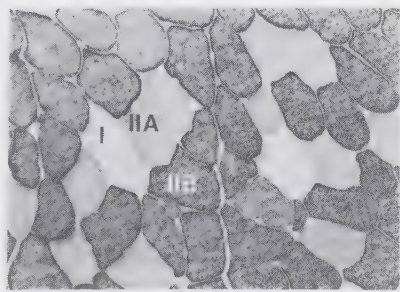
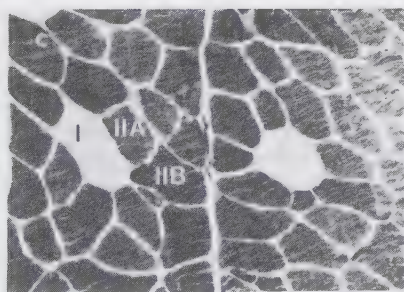
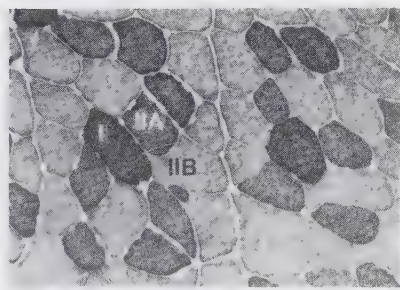
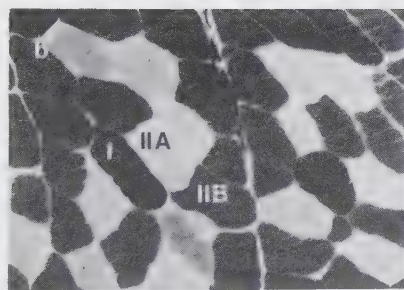
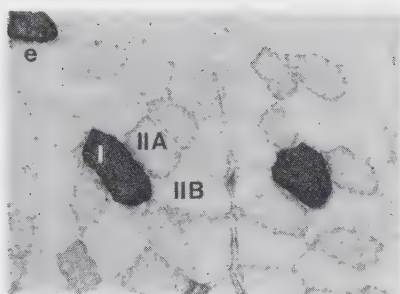
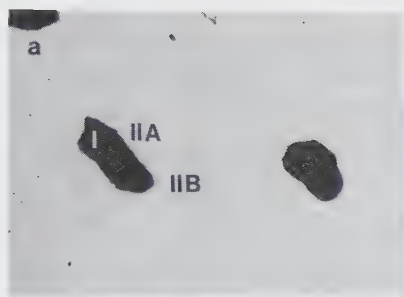


Abbildung 2

Enzymhistochemische und immunzytochemische Fasertypisierung
im M. tibialis anterior des adulten Kaninchens.

a, b, c ATPase-Färbung nach Vorinkubation bei verschiedenen
pH-Werten

a = pH 4.35, b = pH 4.6, c = pH 10.60

d Phosphorylase-Färbung

e, f, g Färbungen der Muskelfasern nach Inkubation mit den
verschiedenen Antiseren

e = mit anti-HLC, f = mit anti-SM, g = mit anti-FM

h NADH-Tetrazoliumreduktase-Färbung.

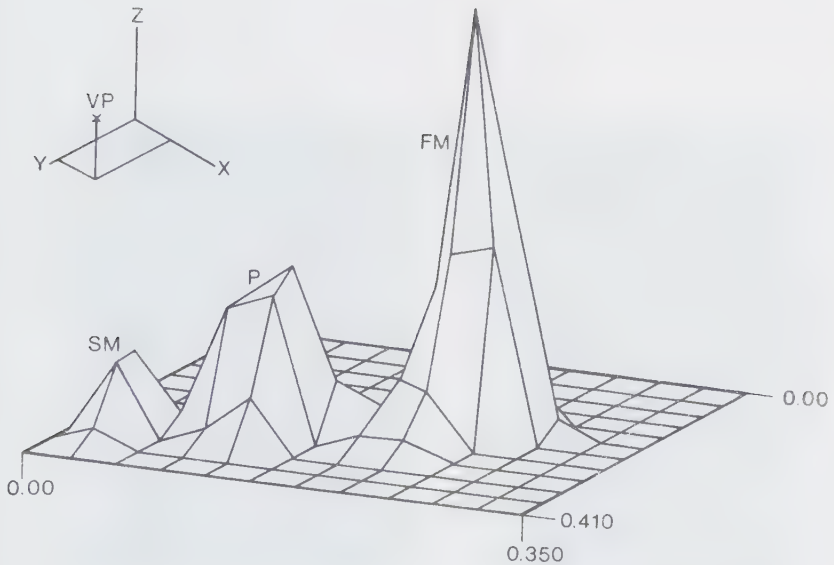


Abbildung 3

Häufigkeitsverteilung der Färbeintensitäten von 132 zufällig ausgewählten Fasern des M. tibialis anterior, inkubiert mit anti-FM bzw. anti-SM. Nachweis der Immunkomplexe mit der Protein A-Peroxidase-Technik (51) und Bestimmung der Extinktionswerte in einem Leitz-Mikroskop-Photometer MPV 2.

- X : Extinktion nach Reaktion der Fasern mit anti-FM
- Y : Extinktion nach Reaktion der Fasern mit anti-SM
- Z : Relative Häufigkeit der Extinktionswerte
- VP : Vom Computer eingestellte Blickrichtung für den optimalen dreidimensionalen Eindruck
- P : Mit beiden Antisera intermediär reagierende Muskelfasern.

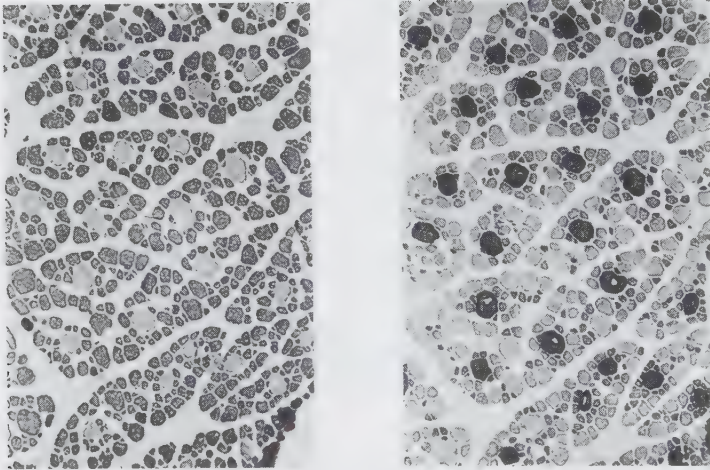


Abbildung 4

Reaktion der Fasern des M. tibialis anterior neugeborener Kaninchen mit Antiseren gegen schnelle Myosine (links) und leichte Ketten von Herzmyosin (rechts).

Darstellung der Immunkomplexe mit der Protein A-Peroxidase-Technik (51).

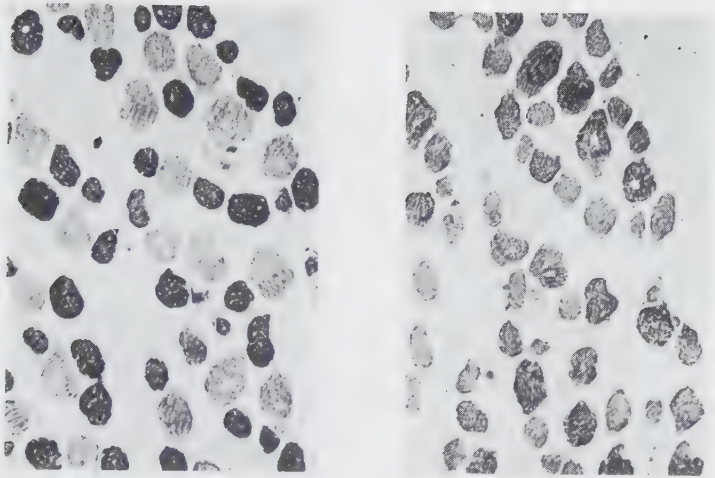


Abbildung 5

Reaktion der Fasern des *M. soleus* neugeborener Kaninchen mit Antiseren gegen schnelle (links) und langsame Myosine (rechts). Nachweis der Immunkomplexe mit der Protein A-Peroxidase-Technik (51).

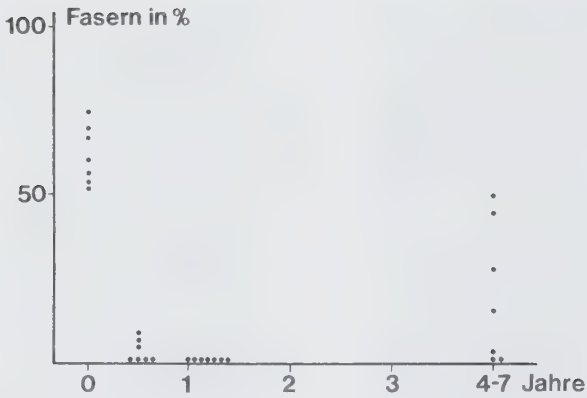


Abbildung 6

Prozentualer Anteil an anti-FM-positiven Fasern (Ordinate) in Mm. solei von Kaninchen in Abhängigkeit vom Alter (Abszisse). Pro Altersstufe $N = 7$. Pro Kaninchen wurden 400 - 500 Fasern ausgezählt.

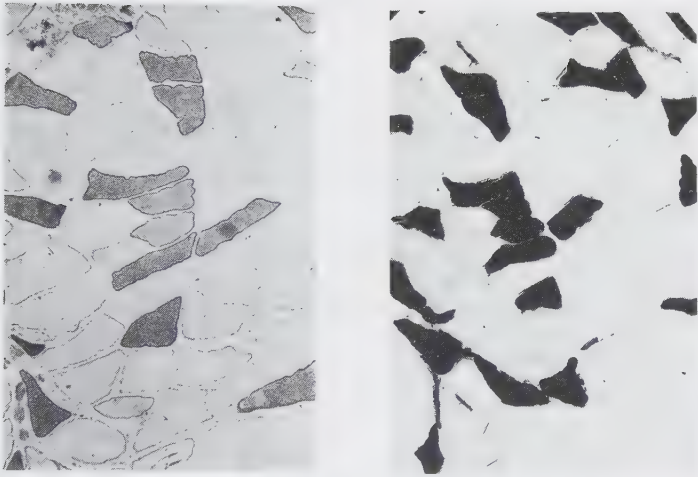


Abbildung 7

Muskelfasern vom *M. soleus* eines 7-jährigen Kaninchens.
Reaktion mit anti-FM (51), links, und Darstellung der Myosin-
ATPase (13) nach Vorinkubation bei pH 10.8, rechts.

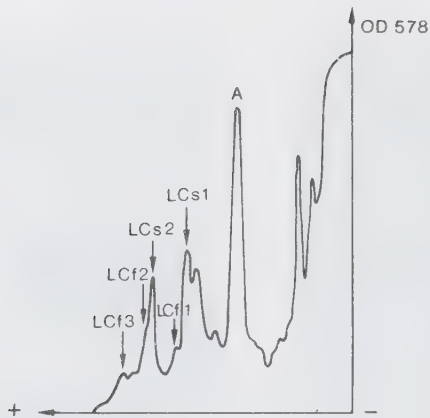


Abbildung 8

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Myofibrillen des M. soleus eines 7-jährigen Kaninchens mit etwa 30% anti-FM positiven Fasern.

OD Extinktion

A Aktin

LCs1 & 2 leichte Ketten der langsamen Kaninchenmyosine

LCf1, 2 & 3 leichte Ketten der schnellen Kaninchenmyosine

7. Dankesadressen

Folgenden Damen und Herren danke ich herzlich für ihre Mitarbeit :

Herrn Prof. Dr. E. Jenny für die Ueberwachung der Arbeit, die Korrektur des Manuskripts und das Referat

Herrn Prof. Dr. C.C. Kuenzle für das Korreferat

Herrn Dr. H. Lutz für die Einführung in die experimentelle Arbeit und für die wertvollen Diskussionen

Herrn W. Römer für die ausgezeichnete technische Arbeit

Herrn R. Billeter für die Mithilfe in der Enzymhistochemie

Herrn Dr. M.C. Schaub für die Präparation von leichten Ketten von Herzmyosin

Herrn Dr. M.R. Celio für die Durchsicht des Manuskripts

Frau J.M. Burger für die sorgfältige Niederschrift des Manuskripts

Frau A. Hug für die photographische und Frau S. Pletscher für die graphische Gestaltung.

Einen besonderen Dank verdient Herr Prof. Dr. H. Fey, Direktor des Vet. bakt. Institutes der Universität Bern, für die grosszügige Bereitstellung von Protein A-Peroxidase-Konjugat.

8. Lebenslauf

WEBER Hans, geboren 1949 in Altdorf UR, Bürger von Leuggern AG

1956 - 1962 Primarschule in Göschenen UR

1962 - 1964 Sekundarschule in Göschenen und Altdorf UR

1965 Kantonsschule in Luzern

1969 Maturitätsprüfung Typ C

1970 - 1971 1 Semester Biochemiestudium an der Abt. X der ETH
in Zürich

1971 Wechsel an die Universität Zürich und Beginn des
Studiums der Tiermedizin an der Veterinärmedizinischen
Fakultät

1976 Eidg. Staatsexamen als Tierarzt

1976 - 1978 Assistent in der Grosstierpraxis von Herrn
B. Bötschi, Tierarzt, Romanshorn TG

1978 - 1980 Assistent am Institut für Pharmakologie und Bio-
chemie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Uni-
versität Zürich

seit 1980 Mitarbeiter am Institut für Toxikologie der ETHZ
und der Universität Zürich, Schwerzenbach ZH.

